REINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG EINER ALKALISCHEN PROTEINASE AUS SKELETTMUSKULATUR DER RATTE

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Erik Fischer

1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536528_0073

Aus der Biochemischen Abteilung
Diabetes - Forschungsinstitut
Der Universtät Düsseldorf
Direktor: Prof.Dr.Reinauer

REINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG EINER ALKALISCHEN PROTEINASE AUS SKELETTMUSKULATUR DER RATTE

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der
Universtät Düsseledorf
vorgelegt von

ERIK FISCHER

1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

Der Universtät Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universtät Düsseldorf
gez.: Prof.Dr.Straßburg

Referent
gez.: Prof.Dr.Reinauer

Korreferent
gez.: Prof.Dr.Mortier

ZUSAMMENFASSUNG

Aus der postmyofibrillären Fraktion des Rattenskelettmuskels wurde ein proteolytisches Enzym isoliert. Das Molekulargewicht des Enzyms wurde mittels Gelfiltration bestimmt. Es beträgt 25000. Das Enzym zeigt maximale Aktivität im alkalischen pH-Bereich (9.4 - 9.6), neben den Substraten Azokasein und $[C^{14}]$- Hämoglobin spaltet es die Chymotrypsin-Substrate Acetyl-tyrosin-äthylester und Benzoyl-tyrosin-äthylester. Für die maximale Stabilität und Aktivität der Proteinase ist eine Konzentration von 1 M KCl in der Lösung erforderlich. Die Proteinase ist vom Serin-Typ, denn sie wird durch Diisopropylfluorophosphat (DFP) sowie durch Phenylmethylsulphonylfluorid gehemmt.

Die myofibrillären Proteine Myosin, Tropomyosin sowie die Untereinheiten des Troponins Tn-T und Tn-C werden durch die gereinigte Proteinase hydrolysiert.

Die Aktivität des Enzyms steigt in Streptozotocin-diabetischen Ratten an, während Behandlung der Ratten mit Insulin die Aktivitätserhöhung der Proteinase verhinderte.

Die Eigenschaften der alkalischen Proteinase wurden mit denen der Mastzell-Chymase, von Kathepsin G sowie zweier anderer alkalischer Proteinasen des Rattenskelettmuskels verglichen.

VERZEICHNIS DER BENUTZTEN ABKÜRZUNGEN

Ac-Tyr-Nan	N-Acetyl-L-tyrosin-p-nitroanilid
Ac-Tyr-OEt	N-Acetyl-L-tyrosin-äthylester
Bz-Tyr-OEt	N-α-Benzoyl-L-tyrosin-äthylester
DFP	Diisopropylfluorophosphat
GSP	"Gruppenspezifische Muskel-Serinprotease"
Leu-Nan	L-Leucin-p-nitroanilid
MAP	"muscle alkaline protease"
PMSF	Phenylmethylsulphonylfluorid
TLCK	Tosyl-lysylchloroketon
TPCK	Tosylphenylchloroketon

EINFÜHRUNG

Der Proteinmetabolismus im Skelettmuskel unterliegt einer hormonellen Regulation. Diese Regulation findet nicht nur auf der Syntheseseite statt, sondern ebenso bei der Abbaurate der Proteine. Während der Einfluß verschiedener Hormone auf den Muskelproteinabbau in zahlreichen Arbeiten untersucht worden ist (Übersicht bei Goldberg u. St.John, 1976), sind die proteolytischen Systeme, die für den Proteinabbau im Skelettmuskel verantwortlich sind, im einzelnen weitgehend unbekannt.(Pennington, 1977). Goldberg und Mitarbeiter (Fulks et al., 1975; Li und Goldberg, 1976) haben gezeigt, daß Insulin die Abbaurate von Proteinen im Rattenskelettmuskel vermindert. Dieser Befund steht im Einklang mit der bekannten Beobachtung des stark erhöhten Muskelproteinabbaus bei unkontrolliertem Diabetes mellitus (Cahill et al., 1972). Darüber hinaus ist bekannt, daß eine bestimmte Gruppe von Muskelzellproteinen, die in stoffwechselgesunden Ratten eine relativ lange Lebensdauer haben, in diabetischen oder hungernden Ratten beschleunigt abgebaut werden.(Dice et al., 1978). Diese Tatsache kann durch drei mögliche Mechanismen erklärt werden: erstens durch eine Veränderung der abzubauenden Proteine, zweitens durch eine Veränderung des proteolytischen Systems im Muskel sowie drittens durch eine Veränderung sowohl der Substratproteine als auch der proteolytischen Enzyme.

Insulinabhängige Veränderungen der proteolytischen Kapazität im Rattenskelettmuskel wurden durch Mayer et al. (1974) sowie durch Röthig et al.(1978) gezeigt. Danach ruft die Induktion eines Diabetes mellitus ein Anwachsen der gesamten alkalischen Muskelproteinaseaktivität hervor, während eine nachfolgende Behandlung der Tiere mit Insulin die Aktivitätswerte auf die Normalwerte zurückführte. Weil diese Veränderungen der proteolytischen Aktivität durch eine entsprechende Zunahme und Normalisierung des Abbaus von myofibrillären Proteinen begleitet wird, wird angenommen, daß das alkalische Proteinasesystem am verstärkten Muskelproteinabbau in diabetischen Ratten beteiligt ist (Dahlmann et al., 1979).

Die alkalische Proteinaseaktivität ist teilweise an Myofibrillenproteine gebunden. Eine Arbeit über die Reinigung und Charakterisierung

dieses Enzyms (myofibrilläre Proteinase) wurde bereits veröffentlicht.(Dahlmann u. Reinauer, 1978). Die gleichen Autoren haben bereits einige Eigenschaften dieser myofibrillären Proteinase mit denen einer anderen alkalischen Proteinase verglichen, die aus der postmyofibrillären Fraktion des Rattenskelettmuskels isoliert wurde (Reinauer u. Dahlmann, 1979).

Die vorliegende Arbeit zeigt den detaillierten Reinigungsprozeß dieser Proteinase, die zum Zwecke der Unterscheidung "zytosolische Proteinase" genannt wird. Außerdem werden die Eigenschaften dieses Enzyms mit denen anderer Proteinasen verglichen, nämlich mit der "muscle alkaline proteinase" (MAP; Noguchi u. Kandatsu, 1971), mit der "group specific proteinase" (GSP; Katunuma et al., 1975) sowie mit der Rattenmastzellchymase (Benditt u. Arase, 1959) und mit Kathepsin G (Starkey u. Barret, 1976a).

Obwohl die zytosolische Proteinase einige Eigenschaften mit den genannten Enzymen gemeinsam hat, zeigen sich doch einige Unterschiede, welche die Identität mit diesen Enzymen unwahrscheinlich macht.

MATERIAL UND METHODEN

a) Material; Versuchstiere und Reagenzien wurden von folgenden Lieferanten bezogen:

- Männliche Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht von ca 200 g von der Firma Winkelmann, Paderborn.
- Sephacryl S-200 superfine sowie Sephadex G-200 und G-75 von Deutsche Pharmacia Gmbh, Freiburg.
- Alle Reagenzien für die Polyacrylamid-Gel Elektrophorese sowie N-α-Benzoyl-L-tyrosin-äthylester, Azokasein, Cytochrom C, Pferdemyoglobin, Rindertrypsin (E.C.3.4.21.4.), Chymotrypsinogen A, Rinder-α-chymotrypsin (E.C.3.4.21.1.) und Rinder-Serumalbumin von der Firma Serva, Heidelberg.
- Eichproteine für die Molekulargewichtsbestimmung durch Elektrophorese in Natriumdodecylsulfat von Bio Rad Laboratories Gmbh, München
- Histamin (freie Base und HCl-Salz), 5-Hydroxytryptamin sowie compound 48/80 (Polymer von N-Methyl-p-methoxyphenäthylamin und Formaldehyd) von Sigma Gmbh, München.

- Streptozotocin von Boehringer, Mannheim und Schweineinsulin von Novo Industrie Gmbh Pharmazeutica, Mainz.
- $K^{14}CNO$ (spez.Radioaktivität 50-60 mCi/mmol) von Amersham Buchler, Braunschweig.

Alle anderen Reagenzien von der Firma Merck, Darmstadt.
Antipain, Chymostatin sowie Leupeptin wurden dankenswerterweise von Dr.H.Fritz (Institut für klinische Chemie und klinische Biochemie, München) zur Verfügung gestellt.
Die gruppenspezifische Muskel-Serinproteinase wurde aus Rattenskelettmuskel nach der Methode von Sanada et al. (1978) isoliert, der letzte Reinigungsschritt (Kristallisation des Enzyms) wurde jedoch weggelassen.

b) Bestimmung der proteolytischen Aktivität

Die Methoden zur Messung der Proteinaseaktivität mit 3% Azokasein oder 6% $[C^{14}]$- Hämoglobin wurden bereits beschrieben (Dahlmann und Reinauer, 1978) und genauso verwendet. Wenn nicht anders angegeben, enthielten alle Ansätze KCl in einer Konzentration von 1 Mol/l. Die Aktivität gegenüber den Substraten Ac-Tyr-OEt und Bz-Tyr-OEt wurde spektrophotometrisch bei 25°C bestimmt (Schwert u. Takenaka, 1955). Die Endkonzentration beider Substrate war in Routineansätzen 1 mMol/l. Die Hydrolyse der Substrate Ac-Tyr-Nan (Endkonzentration 2 mM) und Leu-Nan (Endkonzentration 2.5 mM) wurde durch die Messung des freigesetzten 4-Nitroanilid bei 405 nm bestimmt (Wachsmuth et al., 1966). Die Abhängigkeit der proteolytischen Aktivität vom pH wurde in einem Borat/Citrat/Phosphat-Puffer mit dem gewünschten pH gemessen (Teorell u. Stenhagen, 1938). Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode von Lowry et al. (1951). Als Standard wurde LAB-Trol Kontrollserum der Firma Dade, Miami, USA benutzt.

c) Gelfiltration

Die Reinigung des Enzyms durch Gelfiltration erfolgte in Säulen von 2.5 x 90 cm, die mit Sephacryl S-200 Superfine oder Sephadex G-200 in 1 M KCl/50mM Tris-HCl Puffer, pH 8.5, gepackt waren. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug bei der Sephacrylsäule 39 ml/h, bei der Sephadex-Säule 10ml/h. Das Volumen der gesammelten Fraktionen betrug 13.5 ml.Für die Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration

wurde eine Sephadex G-75 Säule (1.3 x 90 cm) in 1 M KCl/50mM Tris/HCl-Puffer, pH 8.5, benutzt. Die Durchflußgeschwindigkeit dieser Säule betrug 28ml/h und die Fraktionsgröße 5.5 ml. Für die Eichung der Säule wurden folgende Proteine benutzt: Cytochrom C (Mol.-Gew. 12200), Ribonuclease (Mol.-Gew. 13700), Pferdemyoglobin (Mol.-Gew. 17800), Rindertrypsin (Mol.-Gew. 24000), Chymotrypsinogen A (Mol.-Gew. 25000), Ovalbumin (Mol.-Gew. 45000) sowie Rinderserum-Albumin (Mol.-Gew. 68000).

d) Reinigung der myofibrillären Proteine

Die myofibrillären Proteine Myosin, Tropomyosin und Troponin wurden aus Rattenskelettmuskel nach folgenden Methoden aufgearbeitet: Myosin nach Perry (1955), Tropomyosin nach Bailey (1948) und Troponin nach Ebashi et al. (1968).

e) In vitro-Abbau der myofibrillären Proteine

Die Inkubation der gereinigten myofibrillären Proteine mit der gereinigtenMuskelproteinase erfolgte bei 37°C. Enzym/Substrat-Verhältnisse, Pufferlösungen und Inkubationszeiten sind in Abb.8 angegeben. Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben von 0.2 ml entnommen und mit der gleichen Volumenmenge einer Lösung aus 0.1% Na-dodecylsulfat/5mM EDTA/ 50 mM Tris/Glycin, pH 8.8, für 5 min auf 95°C erhitzt.

f) Elektrophorese

Die Elektrophorese im Na-dodecylsulfat/Polyacrylamid-Gel wurde entsprechend der Methode von Prozio u. Pearson (1977) durchgeführt. Die Acrylamid-Konzentration betrug 10% und die Bisacrylamid-Konzentration 0.1%.

Die Disc-Elektrophorese im Polyacrylamid-Gel wurde im System 6 (7.5% Acrylamid, pH 7.5) und System 8 (7.5% Acrylamid, pH 4.3), wie von Mauer (1971) beschreiben, durchgeführt.

g) Proteinaseaktivität während Diabetes mellitus

12 männliche Ratten wurden in drei Gruppen aufgeteilt:
Gruppe D: Vier Ratten erhielten eine intravenöse Injektion von 100mg Streptozotocin/Kg Körpergewicht.
Gruppe DI: Vier Ratten wurden wie Gruppe D behandelt. Beginnend am zweiten Tag nach Induktion des Diabetes wurden die Tiere mit einer

subcutanen Injektion von 5 IU Insulin/Kg Körpergewicht täglich behandelt.
Gruppe N: Vier Ratten waren unbehandelte Kontrolltiere.
Die Tiere aller drei Gruppen wurden am 17.Tag nach Beginn des Experiments getötet und Muskelgewebe wurde vom Oberschenkel des rechten Hinterbeins entnommen. Das Muskelgewebe wurde schnell von Fett und Bindegewebe befreit, in flüssigem Stickstoff gefroren und im Mörser zerkleinert. Ein Gramm Muskelpulver von jeder Ratte wurde in 10 ml 1 M KCl/50 mM-Tris/HCl-Puffer, pH 8.5, homogenisiert. Aufarbeitung des Muskelrohextraktes, Fraktionierung durch Ammoniumsulfatpräzipitation sowie Dialyse des Überstandes nach Ausfällung des Muskelrohextraktes mit einer zu 33% gesättigten Ammoniumsulfatlösung erfolgten wie unter "Reinigung des Enzyms" beschrieben. Das "Dialysesediment" jedes Muskels wurde in 2 ml 1 M KCl/50mM Tris/HCl-Puffer, pH 8.5, aufgenommen und dann auf Proteinkonzentration sowie alkalische Proteinaseaktivität mit $[C^{14}]$- Hämoglobin als Substrat untersucht.

ERGEBNISSE

a) Reinigung des Enzyms

Alle Schritte wurden, wenn nicht anders angegeben, bei 4°C durchgeführt. Ratten wurde 100 g Skelettmuskel der Hinterbeine entnommen, von Fett und Bindegewebe gesäubert und in 1 Liter eines 1 M KCl/50 mM Tris/HCl-Puffer, pH 8.5, homogenisiert. Die Homogenisation erfolgte in einem MSE-Homogenisator für 3 x 30 sec bei 14000 U/min. Unlösliches Bindegewebe wurde mittels Sieben des Homogenats durch Gaze (100 u Porengröße) entfernt. Danach wurde die Lösung 12 h gerührt und anschließend 30 min bei 15000 g zentrifugiert. Der Überstand diente als Muskelrohextrakt.

Um den größten Teil der myofibrillären Proteine abzutrennen, an denen die myofibrilläre Proteinase assoziiert ist (Dahlmann und Reinauer, 1978), wurde dem Muskelrohextrakt Ammoniumsulfat bis zu 33% Sättigung zugegeben; dieser Schritt erfolgte bei 0°C, und danach wurde die Lösung 15 min bei 15000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde durch 15-stündige Dialyse gegen 3 x 10 Liter eines 50mM-Tris/HCl-Puffers, pH 7.5, entsalzt. Eine anschließende Zentrifugation des Dialysats für 30 min bei 15000 g

führte zu einem Präzipitat, welches die alkalische Proteinaseaktivität enthielt. Das Präzipitat wurde in 20 ml 1 M KCl/50 mM-Tris/HCl-Puffer, pH 8.5, aufgenommen. Diese Fraktion wird im weiteren als "Dialyse-Sediment" bezeichnet.

Jeweils 10 ml dieses Dialyse-Sediments wurden auf einer Sephacryl-S 200-Säule in 1 M KCl/50 mM-Tris/HCl-Puffer, pH.8.5, chromatographiert. Diese Gelfiltration ergab eine Fraktionierung in zwei Proteinpeaks, von denen einer im Ausschlußvolummen der Säule erschien und hauptsächlich Aminopeptidaseaktivität enthielt, wie an der deutlichen Hydrolyse von Leu-Nan sichtbar (Peak I, Abb.1). Der andere Peak, bestehend aus Proteinen von kleinerem Molekulargewicht, enthielt den größten Teil der alkalischen Proteinaseaktivität (Peak II, Abb.1)

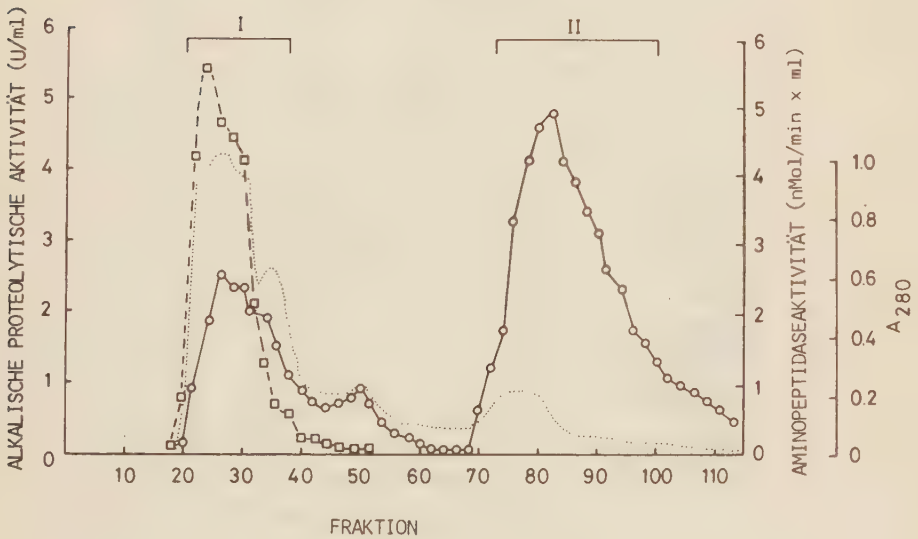

Abb.1 Chromatographie des Dialyse-Sediments auf Sephacryl S-200

Einzelheiten s. unter "Methoden"

o——o = Alkalische Proteolytische Aktivität, gemessen mit Azokasein

□——□ = Aminopeptidaseaktivität, gemessen mit Leu-Nan als Substrat

----- = Absorption bei 280 nm

Die Balken zeigen die Fraktionen, die gepoolt und als Peak I und II bezeichnet wurden.

Die Fraktionen des Peak II wurden vereint und in einer Amicon-Zelle (YM-10 Membran) auf 10 ml konzentriert. Da nach dieser Konzentrierung von Peak II noch geringe Aminopeptidaseaktivität nachzuweisen war, wurde die Enzymlösung auf einer Sephadex G-200 Säule chromatographiert. Diese Rechromatographie zeigte eine ähnliche Fraktionierung wie in der ersten Gelfiltration (Abb.1), jedoch war Peak I wesentlich kleiner. Die Fraktionen des Peak II wurden wieder vereint und erneut in einer Amicon-Zelle konzentriert. Die Enzymlösung war jetzt frei von Aminopeptidaseaktivität und zeigte gegenüber dem Muskelrohextrakt eine Anreicherung um den Faktor 1144.

Die Aufarbeitungsschritte sowie ihr Reinigungseffekt sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1 — Reinigungsschema der zytosolischen Proteinase aus Rattenskelettmuskel

Die Enzymaktivität wurde mit Azokasein als Substrat gemessen

Aufarbeitungsschritt	Gesamtprotein (mg)	Gesamtaktivität (U)	Spezif. Aktivität (U/mg Protein)	Anreicherung (fach)	Ausbeute (%)
Muskelrohextrakt	17 955	21 405	1.1	1	100
Dialyse-Sediment	205	2 077	10.1	9	9.7
Sephacryl-S-200 Peak II	1.41	571	405	368	2.6
Sephadex-G-200 Peak II	0.22	277	1 259	1 144	1.3

Die Reinheit der Enzympräparation wurde durch Disk-Elektrophorese überprüft. Proteolytische Aktivität mit Hilfe des Photopapiertest (Jany, 1976) konnte nur nachgewiesen werden, wenn das Präparat im kathodischen (pH 4.3) System elektrophoriert wurde. Die Proteolytische Aktivität erschien dabei jedoch als sehr breite und diffuse

Bande, wahrscheinlich aufgrund der hohen KCl-Konzentration, die nötig war, um das Enzym in Lösung zu halten.(s.unten). Bei Elektrophorese im neutralen Puffer (pH 7.5) konnte weder Protein noch proteolytische Aktivität nachgewiesen werden.

b) pH - Optimum

Optimale Hydrolyse sowohl von Azokasein als auch von $[C^{14}]$- Hämoglobin durch das gereinigte Enzym wurde zwischen pH 9.2 und 9.6 gemessen, es war jedoch beträchtliche Aktivität auch im neutralen pH-Bereich nachzuweisen (s.Abb.2)

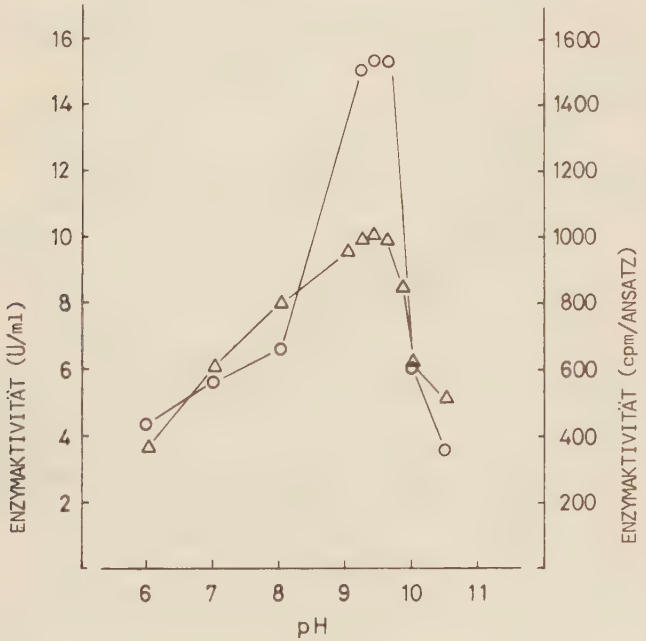

Abb.2 Der Effekt des pH-Wertes auf die Aktivität der gereinigten zytosolischen Proteinase

Die Aktivität der Proteinase wurde bei verschiedenen pH-Werten mit Azokasein(o——o) und $[C^{14}]$- Hämoglobin(Δ——Δ) als Substraten bestimmt. Einzelheiten s. unter "Methoden".

c) Einfluß der KCl - Konzentration

Die Löslichkeit der alkalischen Proteinase ist abhängig von der KCl - Konzentration. Wie Abb.3 zeigt, führt die Verringerung der KCl-Konzentration zu einem 20 - 40% Verlust der Aktivität.

Ferner ist das Enzym für mehrere Tage stabil, wenn es in 1 M KCl/ 50mM-Tris/HCl-Puffer, pH 8.5, bei 4°C gelöst ist, es verliert jedoch den größten Teil seiner Aktivität innerhalb von 24 h, wenn die KCl-Konzentration verringert wird (s.Abb. 3).

Aus diesem Grunde wurde das Enzym immer in Puffer aufbewahrt und getestet, der 1 M KCl enthielt.

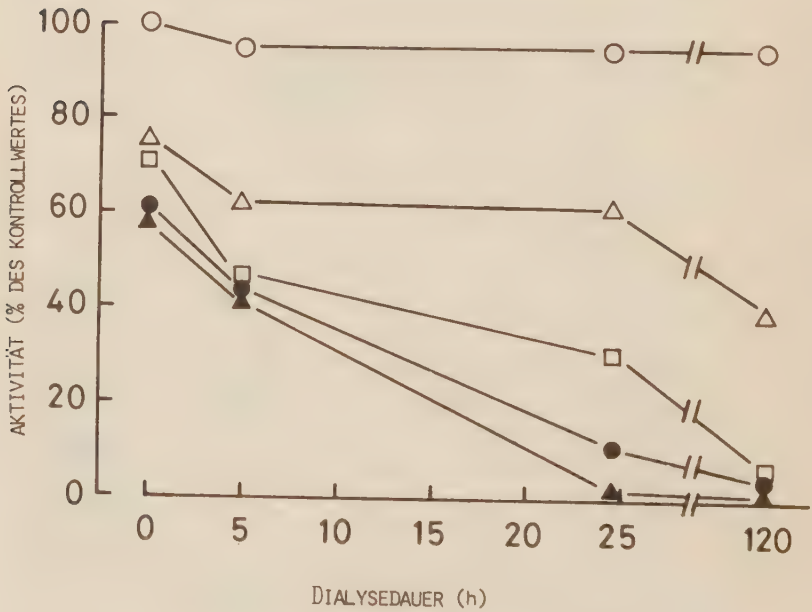

Abb.3 Effekt der KCl-Konzentration auf die Aktivität und Stabilität der gereinigten zytosolischen Proteinase

Zytosolische Proteinaselösung (3 U/ml in 1 M KCl/50mM-Tris/HCl-Puffer, pH 8.5) wurde mit 50mM-Tris/HCl-Puffer, pH 8.5, verdünnt, sodaß KCl-Konzentrationen von 0.6 M (△——△), 0.4 M (□——□), 0.2 M (●——●), sowie 0.1 M (▲——▲) resultierten. Die Aktivität wurde unmittelbar nach Verdünnung sowie nach jeweils 5, 24 und 120 h Inkubation bei 4°C in den jeweiligen KCl-Konzentrationen gemessen und mit dem Ausgangswert von 1 M KCl-Konzentration verglichen (o——o).

Die Aktivität wurde mit Azokasein als Substrat gemessen.

d) Einfluß der Temperatur

Die enzymatische Spaltung von Azokasein durch das gereinigte Enzym verlief linear in Abhängigkeit von der Zeit und erhöhte sich mit der Inkubationstemperatur (s.Abb.4).

Wie Abb.5 zeigt, tritt eine rasche Denaturierung des Enzyms bereits bei 47°C auf.

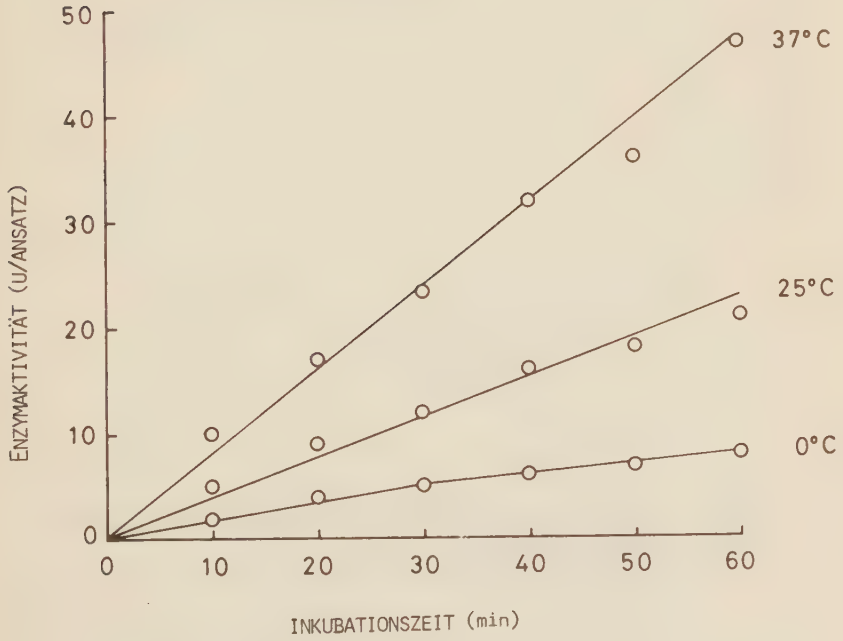

Abb.4 Einfluß der Temperatur im Enzymansatz auf die Aktivität der zytosolischen Proteinase

Das gereinigte Enzym wurde mit Azokasein als Substrat bei verschiedenen Temperaturen inkubiert (0, 25, 37°C); die Enzymreaktion wurde zu den angegebenen Zeiten gestoppt.

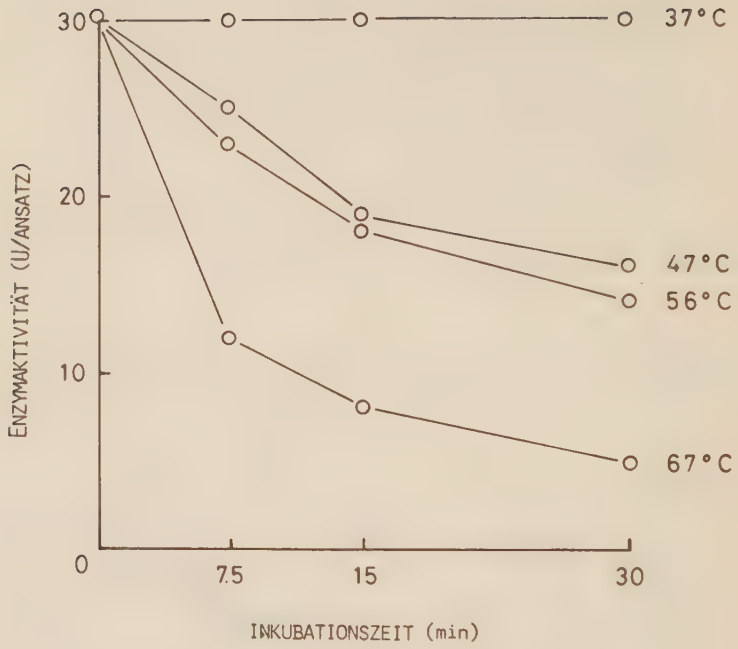

Abb.5 Stabilität der gereinigten zytosolischen Proteinase bei verschiedenen Temperaturen

Gereinigte zytosolische Proteinase wurde bei verschiedenen Temperaturen (37, 47, 56, 67°C) für verschieden lange Zeiten (7.5, 15, 30 min) vorinkubiert. Danach wurde die Aktivität des Enzyms durch die Spaltung von Azokasein bei 37°C für eine Stunde gemessen. Aktivitäten sind angegeben als Prozent der Aktivität bei 37°C ohne Vorinkubation.

e) Molekulargewicht

Das Molekulargewicht der gereinigten Proteinase wurde auf einer geeichten Sephadex G-75 Säule bestimmt und beträgt etwa 25000 (s.Abb.6)

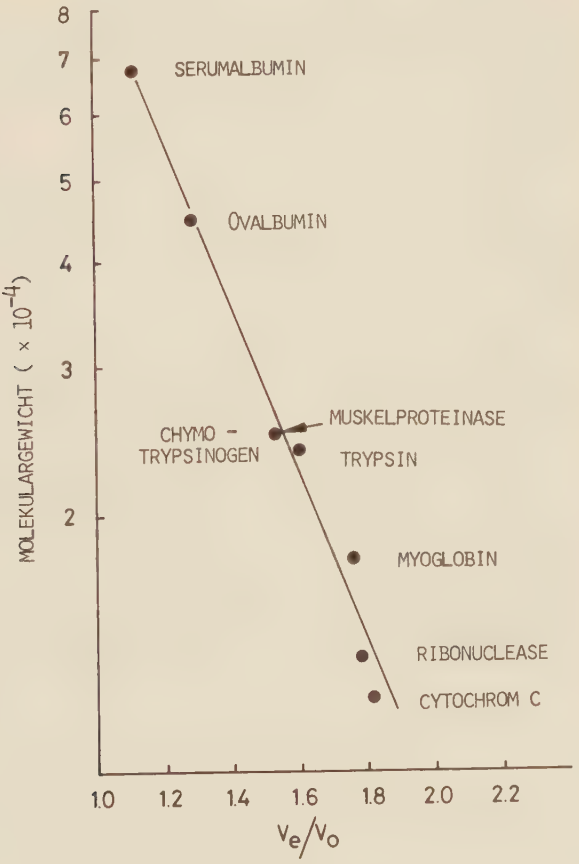

Abb.6 Molekulargewichtsbestimmung der gereinigten zytosolischen Proteinase durch Gelfiltration auf Sephadex G-75
Einzelheiten s. "Methoden". V_o wurde mit Dextranblau bestimmt.

f) Einfluß von Inhibitoren

Der Effekt verschiedener Proteinase-Inhibitoren auf die Aktivität der gereinigten zytosolischen Proteinase wurde getestet und mit ihrem Einfluß auf GSP und Schweine-α-Chymotrypsin verglichen.

Wie Tabelle 2 zeigt, wird die zytosolische Proteinase durch DFP sowie durch PMSF gehemmt. Sie ist somit genauso wie GSP und Chymotrypsin eine Serin-Proteinase. SH-Gruppen blockierende Reagenzien sowie Metallchelatoren beeinflußen die Aktivität der zytosolischen Proteinase nicht, aber vergleichbar mit GSP und Chymotrypsin wird sie durch reduzierende Substanzen wie Cystein und Dithiothreitol gehemmt.

Ca-Ionen haben einen hemmenden Einfluß auf die GSP-Aktivität, was auch schon von Katunuma et al.(1975) gezeigt wurde. Wie Chymotrypsin bleibt auch die zytosolische Proteinase unbeeinflußt durch Ca-Ionen.

Demgegenüber haben von allen getesteten natürlichen Proteinase-Inhibitoren auf die zytosolische Proteinase und auf GSP nur Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor, Limabohnen-Trypsin-Inhibitor sowie α-Antitrypsin einen hemmenden Einfluß, während im Gegensatz dazu Chymotrypsin durch alle anderen Inhibitoren gehemmt wird.

Wie schon früher gezeigt wurde (Reinauer und Dahlmann, 1979), hat die zytosolische Proteinase Chymotrypsin-ähnliche Eigenschaften und wird somit durch TPCK sowie Phenylbutylamin, nicht jedoch durch TLCK und Benzamidin gehemmt. Dagegen wird die GSP-Aktivität durch Phenylbutylamin nicht gesenkt, während die Aktivität aller drei Enzyme durch Chymostatin verringert wird.

Tabelle 2

Inhibitor		Endkonzentration (mM)	Aktivität (% des Kontrollwertes) Zytosolische Proteinase	GSP	Chymotrypsin
DFP	(a)	1	0	21	0
PMSF	(a)	1	0	0	0
Jodoacetamid		1	100	103	100
p-Hydroxymercuri-phenylsulphonylsäure		1	100	88	97
N-Äthylmaleimid		5	77	94	105
Cystein		5	46	0	0
Dithiothreitol		5	39	0	0
EDTA		1	98	95	100
1,10-Phenanthrolin	(b)	1	97	93	84
$CaCl_2$		1	109	56	100
Sojabohnen-Trypsin Inhibitor		0.1 mg/ml	0	7	0
Limabohnen-Trypsin-Inhibitor		0.1 mg/ml	0	7	0
α-Antitrypsin (human)		0.1 mg/ml	30	14	0
Aprotinin		0.1 mg/ml	100	100	0
Rinderpankreas-Trypsin-Inhibitor		0.5 mg/ml	100	106	0
Ovomucoid (Huhn)		0.1 mg/ml	100	106	100
Ovomucoid (Truthahn)		0.1 mg/ml	100	100	6
Ovoinhibitor (Huhn)		0.1 mg/ml	100	106	0
TLCK		1	100	106	103
Benzamidin		5	100	97	97
TPCK	(a)	1	70	72	10
		3	21	44	n.b.
Phenylbutylamin		2	44	n.b.	n.b.
		5	n.b.	93	54
Antipain		0.01 mg/ml	85	92	100
Chymostatin	(c)	0.01 mg/ml	62	50	27
Leupeptin		0.01 mg/ml	96	92	100

Tabelle 2 Einfluß von Inhibitoren

0.1 ml Enzymlösung (5 U/l) sowie 0.1 ml der entsprechenden Verbindung wurden bei 20°C für 10 min vorinkubiert, lediglich bei DFP, PMSF, TLCK sowie TPCK betrug die Vorinkubationszeit 60 min.

Zur Reaktion mit der zytosolischen Proteinase wurden die Reagenzien in 1 M KCl/50mM-Tris/HCl-Puffer, pH 7.5, gelöst, zur Reaktion mit Chymotrypsin in 50mM-Tris/HCl-Puffer, pH 7.5, zur Reaktion mit GSP in 0.25 M $K_2(PO_4)$-Puffer, pH 7.5. (Lediglich die GSP-Reaktion mit $CaCl_2$ wurde in 1 M KCl/50mM-Tris/HCl-Puffer, pH 7.5, durchgeführt).
(a) = Testansatz enthielt 5 Vol.% Propan-2-ol
(b) = Testansatz enthielt 2 Vol.% Äthanol
(c) = Testansatz enthielt 10 Vol.% Dimethyl-sulphoxyd
Nach der Vorinkubation wurden die Enzymaktivitäten mit Azokasein als Substrat bestimmt.

g) Einfluß von zweiwertigen Metallionen

Wie Tabelle 3 zeigt, wird die zytosolische Proteinase durch Fe^{2+},Co^{2+} sowie Zn^{2+}, nicht jedoch durch Mn^{2+}, Mg^{2+} sowie Ca^{2+} - Ionen gehemmt.

Salz	Konz. (mM)	Aktivität (in % des Kontrollwertes) 0.01	0.1	1.0
$(NH_4)_2Fe(SO_4)_2$		100	82	22
$CoCl_2$		84	56	41
$ZnCl_2$		84	56	41
$MgCl_2$		94	91	84
$MnCl_2$		100	100	100
$CaCl_2$		100	100	100

Tabelle 3 Einfluß von zweiwertigen Metallionen auf die Aktivität der zytosolischen Proteinase

Die proteolytische Aktivität wurde mit Azokasein als Substrat bestimmt nach Vorinkubation des Enzyms mit dem Metallsalz in 1 M KCl/50mM-Tris/HCl-Puffer, pH 8.5, bei 20°C für 10 min.

h) Spaltung synthetischer Substrate

Es wurde bereits an anderer Stelle gezeigt (Reinauer und Dahlmann, 1979), daß die Chymotrypsin-Substrate Benzoyl-tyrosin-äthylester sowie Acetyl-tyrosin-äthylester von der zytosolischen Proteinase gespalten werden, während die Substrate, die Arginin statt Tyrosin enthalten, durch das Enzym nicht angegriffen werden.

Wie Tabelle 4 zeigt, ist die Affinität von Bz-Tyr-OEt zum gereinigten Enzym höher als die des Ac-Tyr-OEt. Dennoch wird Ac-Tyr-OEt wesentlich schneller abgebaut (K_{cat} ist für Ac-Tyr-OEt etwa 7fach höher als für Bz-Tyr-OEt), sodaß sich ein höherer K_{cat}/K_m - Quotient für dieses Substrat fand.

	K_m (mM)	V_{max} (uMol/min x mg)	K_{cat} (s^{-1})	K_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$)
Bz-Tyr-OEt	4.8	10.5	4.38	912.5
Ac-Tyr-OEt	14.3	75.2	31.33	2190.9

Tabelle 4 — Kinetische Parameter für die Hydrolyse zweier Estersubstrate durch die zytosolische Proteinase

K_m-Werte wurden mit Enzymkonzentrationen zwischen 12 - 60 x 10^{-9} mol/l (auf der Basis eines Molekulargewichts von 25000, s.Abb.6) bestimmt. Die Substratkonzentrationen lagen zwischen 5 x 10^{-5} und 2 x 10^{-3} mol/l.

i) Einfluß von Heparin, 5-Hydroxytryptamin sowie Histamin

Die gereinigte zytosolische Proteinase wurde mit 5 mM Heparin sowie mit 10^{-4} bis 10^{-2} M 5-Hydroxytryptamin bei 20°C für 60 min vorinkubiert. Keine der beiden Verbindungen beeinflußte die Aktivität des Enzyms. Eine Vorinkubation des Enzyms mit Histamin steigerte jedoch die Enzymaktivität. Es handelt sich um eine dosisabhängige Steigerung der Aktivität, die sich in der gleichen Größenordnung bewegte, wenn wenn Hämoglobin und Azokasein als Substrate verwendet wurden.

Wenn die Aktivität mit Ac-Tyr-Nan als Substrat gemessen wurde, war eine geringere Aktivitätssteigerung des Enzyms nachzuweisen (s.Abb.7).

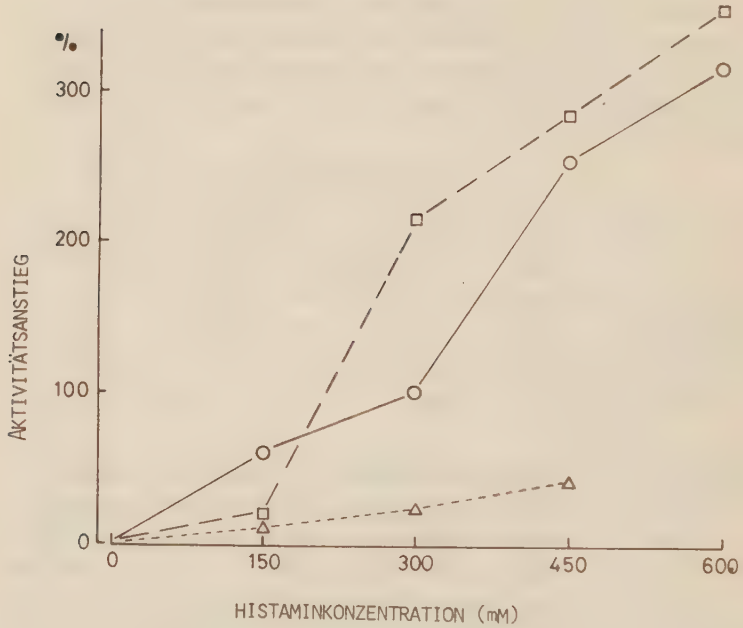

Abb.7 Einfluß von Histamin auf die Aktivität der gereinigten zytosolischen Proteinase

Eine wässrige Lösung von 0.6 M Histamin-HCl wurde mit einer wässrigen Lösung 0.6 M Histamin (freie Lauge) auf einen pH von 7.5 titriert. Das Enzym wurde mit verschiedenen Konzentrationen dieser Hisatminlösung (150, 300, 450, 600 mM) bei 20°C jeweils 60 min vorinkubiert. Danach wurde die Aktivität mit $[C^{14}]$- Hämoglobin (□——□), Azokasein (○——○) sowie Ac-Tyr-Nan (△——△) als Substraten gemessen. Die Aktivitäten sind als Prozent eines Ansatzes ohne Histamin angegeben.

j) Spaltung myofibrillärer Proteine

Wie Abb. 8a zeigt, wird die schwere Kette ("heavy chain") des Myosin durch die zytosolische Proteinase sehr schnell in mehrere große Fragmente mit einem Molekulargewicht von 174000 bis 136000 gespalten. Die Schwere Kette sowie die großen Fragmente waren nach 30 min Inkubation vollständig abgebaut. Nur die beiden Fragmente mit dem Molekulargewicht von 146000 sowie 136000 waren noch für 2 bis 3 h stabil. Die weitere Spaltung dieser Fragmente führte zu Subfragmenten mit einem Molekulargewicht von 75000, 65000, 45000 sowie 40000.

Tropomyosin war nach drei Stunden Inkubation mit zytosolischer Proteinase vollständig abgebaut. Die Hauptspaltprodukte hatten Molekulargewichte von 34000, 23000, 20000 und 19000 (s.Abb 8b).

Der Abbau des Troponin-Komplexes durch die zytosolische Proteinase erfolgte im wesentlichen genauso wie bereits für die myofibrilläre Proteinase gezeigt (Reinauer u. Dahlmann, 1979), insbesondere wurden die Troponin-T und Troponin-C Untereinheiten in 5 bis 10 min abgebaut, während die Troponin-I Untereinheit während der dreistündigen Inkubationszeit nicht angegriffen wurde.

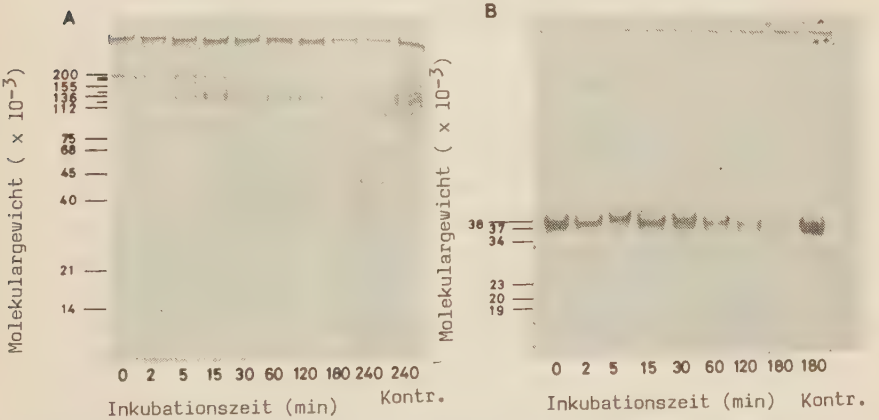

Abb.8 Abbau von Myosin und Tropomyosin durch zytosolische Proteinase

A) Gereinigtes Myosin und zytosolische Proteinase wurden in einem Gewichtsverhältnis von 360/1 in 0.5 M KCl/0.2M-Tris/HCl-Puffer, pH 8.5, inkubiert.
B) Gereinigtes Tropomyosin und zytosolische Proteinase wurden in einem Gewichtsverhältnis von 130/1 in 1 M KCl/0.15M Na-Phosphat-Puffer, pH 8.0, inkubiert
Kontrollen wurden ohne Enzyme inkubiert, Einzelheiten s. "Methoden".

k) Einfluß von Diabetes mellitus

Durch Induktion eines Diabetes mellitus stieg im Dialyse-Sediment der Proteingehalt um 133%, die alkalische proteolytische Aktivität jedoch um rund 500%, verglichen mit den normalen Kontrollen. Das bedeutet, daß die spezifische proteolytische Aktivität im alkalischen Bereich in dieser Muskelfraktion bei diabetischen Ratten verdoppelt wird.

Eine tägliche Behandlung der diabetischen Ratten mit Insulin verhinderte diesen Anstieg der Aktivität und des Proteins im Dialyse-Sediment. (s.Abb.9)

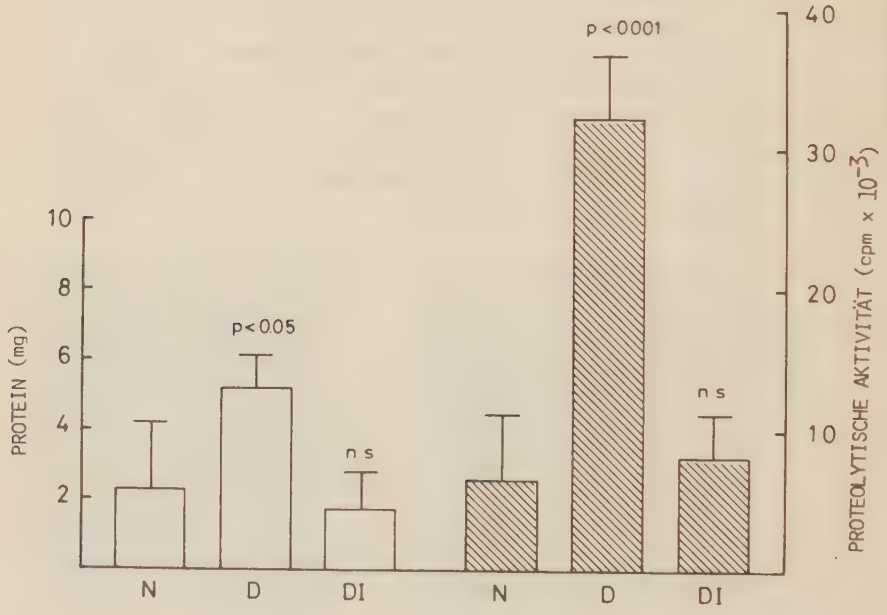

Abb.9 Proteingehalt und alkalische Proteinaseaktivität im Dialyse-Sediment bei normalen (N), diabetischen (D) und diabetischen Ratten nach Insulinbehandlung (DI)

Einzelheiten s.u. "Methoden"
□ = Proteingehalt
▨ = Proteinaseaktivität mit $[C^{14}]$- Hämoglobin als Substrat
Die Säulen stellen Mittelwerte (± S.E.M.) von 4 Ratten dar. Statistische Unterschiede von D und DI verglichen zu N wurden durch student`s t-test bestimmt.
n.s. = kein signifikanter Unterschied

1) Einfluß von compound 48/80

Fünf Ratten wurden steigende Mengen der Histamin-ausschüttenden Verbindung "compound 48/80" nach dem Schema von Pastan und Almquist (1966) injiziert. Die Behandlung dauerte fünf Tage, danach wurden die Tiere getötet und aus der Hinterbeinmuskulatur wurde die zytosolische Proteinase bis zum Schritt "Dialyse-Sediment" isoliert. In keinem der Dialyse-Sedimente der fünf Tiere war alkalische proteolytische Aktivität mit den Substraten Azokasein und $[C^{14}]$-Hämoglobin nachweisbar.

DISKUSSION

Die Auftrennung des Muskelrohextraktes durch Ammoniumsulfatfällung führt zur Trennung in eine myofibrilläre Fraktion sowie in eine "post-myofibrilläre Fraktion". Die alkalische proteolytische Aktivität wurde von der letzteren abgetrennt, indem das Enzym durch Dialyse gegen Puffer von geringer Ionenkonzentration präzipitiert wurde. Dieses Dialyse-Sediment enthält ungefähr 10% der gesamten alkalischen Proteinaseaktivität, die im Muskelrohextrakt nachweisbar war. Die Aktivitätsausbeute in diesem Dialyse-Sediment konnte weder durch eine zeitliche Verlängerung der Dialyse noch durch eine weitere Ammoniumsulfatausfällung (70% Salzsättigung) anstelle des Aussalzungsvorgangs vergrößert werden. Da 50% der gesamten alkalischen Proteinaseaktivität in der Myofibrillenfraktion nachgewiesen werden (Dahlmann und Reinauer, 1978), kann der Rest von 40% anderen proteolytischen Enzymen zugeschrieben werden. Das heißt, daß das Enzym, das hier aus dem Muskelrohextrakt 1loo-fach angereichert wurde, nur eine Komponente des alkalischen proteolytischen Systems ist.

Wie bereits erwähnt, ist die zytosolische Proteinase deutlich verschieden von der myofibrillären Proteinase (Reinauer und Dahlmann, 1979). Daneben gibt es verschiedene andere Arbeiten über alkalische Proteinasen im Rattenskelettmuskel: Noguchi und Kandatsu (1971) isolierten eine alkalische Proteinase aus der Myofibrillenfraktion des Rattenskelettmuskels und verglichen später diese alkalische Muskelproteinase ("MAP") mit einer Chymotrypsin-ähnlichen Proteinase (Chymase) aus Mastzellen der Ratte (Noguchi und Kandatsu, 1976). Dabei fanden sie einige ähnliche Eigenschaften zwischen beiden Enzymen und konnten

nicht ausschließen, daß die MAP aus Mastzellen des Muskelgewebes stammt.

Die von Katunuma et al. (1975) beschriebene gruppenspezifische Muskel-Serinprotease ("GSP") ist möglicherweise ebenfalls identisch mit der Mastzell-Chymase (Woodbury et al., 1978).

Da die Mastzell-Chymase (Benditt u. Arase, 1959; Kawiak et al., 1971; Yurt u. Austen, 1977) in ihren Eigenschaften große Ähnlichkeit mit denen von Kathepsin G aus der Milz des Menschen (Starkey u. Barret, 1976 a,b) hat, vermutete Starkey (1977), daß Chymase und Kathepsin G dieselben Enzyme sind.

Da in unserer Untersuchung die Behandlung der Ratten mit compound 48/80 einen totalen Verlust der zytosolischen Proteinaseaktivität zur Folge hatte, ist es möglich, daß auch dieses Enzym in den Mastzellen lokalisiert ist. Deshalb erscheint ein Vergleich der zytosolischen Proteinase mit der Mastzell-Chymase und denjenigen Proteinasen, welche möglicherweise aus der Mastzelle stammen, sinnvoll.

Einige Eigenschaften dieser fünf Enzyme zeigt Tabelle 5 (s.unten).

Hinsichtlich der Molekulargewichte, der pH-Optima, der Abhängigkeit von hohen Ionenkonzentrationen sowie ihrer Klassifizierung in die Gruppe der Serin-Proteinasen ist kein entscheidender Unterschied erkennbar (Tab.5). Aus den Quellen für die Tabelle 5 geht ebenfalls hervor, daß alle fünf Enzyme durch das Halomethylketon TPCK sowie durch Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor gehemmt werden. Alle Enzyme zeigen auch esterolytische Aktivität gegenüber Bz-Tyr-OEt und/oder Ac-Tyr-OEt, ausgenommen MAP, die in dieser Hinsicht nicht untersucht wurde.

Neben diesen ähnlichen Eigenschaften gibt es auch andere, durch die sich die fünf Enzyme unterscheiden: im Gegensatz zur zytosolischen Proteinase wird Kathepsin G durch TLCK, durch den Pankreas-Trypsin-Inhibitor sowie durch Ovoinhibitor (Starkey u. Bsrret, 1976 b) teilweise gehemmt. Chymase, Kathepsin G sowie die zytosolische Proteinase haben positive Nettoladung in der Polyacrylamidgel-Elektrophorese bei pH 4.3 (Tab.5). GSP dagegen bewegt sich in diesem Elektrophoresesystem zur Anode (Sanada et al., 1978). Ferner wird GSP durch Calcium-Ionen gehemmt, was Katunuma et al.(1975) sowie die vorliegende Arbeit (Tab.2) zeigt, während Ca-Ionen in einer Konzentration von 1mM keinen Effekt auf die Aktivität der zytosolischen Proteinase, von MAP,Chymase oder Kathepsin G haben.

	MAP (1,2)	GSP (3,4,5,6)	Chymase (2,7,8)	Kathepsin G (9,10)	Zytos.Proteinase (6,11)
Molekulargewicht	22 000	22-24 000	25 000	17 000 27-30 000	25 000
KCl - Abhängigkeit	ja	ja	ja	ja	ja
pH - Optimum	9.5 - 10	8.6 - 9.0	9.5 - 10	7.5 - 8.0	9.4 - 9.6
Elektrische Nettoladung bei pH 4.5	n.best.	negativ	positiv	positiv	positiv
Einfluß von					
DFP	Hemmung	Hemmung	Hemmung	Hemmung	Hemmung
Thiol-Effektoren	ohne Einfl.	ohne Einfl.	ohne Einfl.	ohne Einfl.	ohne Einfl.
Pepstatin	n.best.	ohne Einfl.	n.best.	ohne Einfl.	n.best.
Metallchelatoren	ohne Einfl.	ohne Einfl.	n.best.	ohne Einfl.	ohne Einfl.

Tabelle 5 Eigenschaften von MAP, GSP, Mastzell-Chymase, Kathepsin G sowie Zytosolischer Proteinase

Die Zahlen in Klammern bezeichnen die folgenden Arbeiten, in denen die Eigenschaften der Enzyme detailliert beschrieben sind: (1) Noguchi und Kandatsu (1971); (2) Noguchi u. Kandatsu (1976); (3) Katunuma et al., (1975); (4) Sanada et al. (1978); (5) Woodbury et al, (1978); (6) vorliegende Arbeit; (7) Kawiak et al. (1971); (8) Yurt u.Austen (1977); (9) Starkey u. Barret (1976a); (10) Starkey u. Barret (1976 b); (11) Reinauer u. Dahlmann (1979).

Yasogawa et al. (1978) haben gezeigt, daß GSP die schwere Kette von Myosin in Fragmente mit einem Molekulargewicht von 100000 und 80 000 spaltet. Die zytosolische Proteinase produziert zahlreiche Abbaufragmente im Molekulargewichtsbereich von 176 000 bis 136 000, welche weiter in Peptide vom Molekulargewicht 75 000, 68 000, 45 000 und 40 000 gespalten werden (Abb. 8a). Das Muster der Abbauprodukte von Tropomyosin ist für beide Enzyme im wesentlichen gleich, dagegen führt die Inkubation des Troponin-Komplexes mit GSP zu einem Abbau der Troponin-T und Troponin-I Untereinheiten (Yasogawa etal. 1978), während die zytosolische Proteinase die Troponin-T und Troponin-C Untereinheiten spaltet.

Unter Berücksichtigung aller Fakten ähneln die Eigenschaften der zytosolischen Proteinase denen der GSP und MAP, obwohl einige ihrer Eigenschaften offensichtlich unterschiedlich sind. Auf der anderen Seite hat die zytosolische Proteinase viele identische Eigenschaften mit der Mastzell-Chymase. Deshalb liegt die Vermutung nahe, daß die alkalische proteolytische AKtivität im Rattenskelettmuskel aus den Mastzellen stammt.(Park et al., 1973; Drabikowski et al., 1976; Woodbury et al., 1978).

Der komplette Verlust der zytosolischen Proteinaseaktivität nach Behandlung der Tiere mit "compound 48/80" kann ebenfalls in dieser Hinsicht interpretiert werden. Compound 48/80 mobilisiert die intrazellulären Calciumspeicher in Mastzellen, was zu deren Degranulierung führt (Atkinson et al., 1979). Über den Einfluß von compound 48/80 auf andere Zelltypen, insbesondere Muskelzellen, ist jedoch nichts bekannt.

Ferner haben Yurt und Austen (1977) beschrieben, daß die Mastzell-Chymase durch 5-Hydroxytryptamin sowie durch hohe Konzentrationen an Histamin (300 mM) gehemmt wird, während dagegen die Aktivität der zytosolischen Proteinase durch Histamin stark stimuliert und durch 5-Hydroxytryptamin überhaupt nicht beeinflußt wird. (Abb.7)

So erscheinen die Ergebnisse zunächst widersprüchlich,und die Identität und Nicht-Identität der verschiedenen Proteinasen muß durch immunologische Untersuchungen sowie durch Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung bewiesen werden. Neben der genauen Lokalisation muß

auch die Funktion der zytosolischen Proteinase im Muskelgewebe untersucht werden. Die Hypothese, daß das Enzym am Abbau der Myofibrillenproteine beteiligt sein könnte, stützt sich auf folgende Untersuchungen: der Induktion eines Diabetes mellitus durch Streptozotocin-Injektion folgte sowohl ein Anwachsen der Proteinaseaktivität (Abb.9) als auch des Actomyosin-Abbaus, welcher durch die Ausscheidung von 3-Methylhistidin im Urin gemessen wurde (Dahlmann et al., 1979). Behandlung der Tiere mit Insulin führte zu einer Normalisierung beider Vorgänge. Da myofibrilläre Proteine durch die zytosolische Proteinase abgebaut werden können (Abb.8), liegt ein Zusammenhang zwischen Proteinaseaktivität und Actomyosinabbau nahe. Wenn aber auf der anderen Seite das Enzym in den Mastzellen lokalisiert sein sollte, bleibt seine Funktion im intrazellulären (myofibrillären) Proteinabbau zur Zeit noch ungeklärt.

Diese Untersuchungen wurden unterstützt durch das Ministerium für Wissenschaft und Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen, Düssledorf, durch das Ministerium für Jugend, Familie und Gesundheit, Bonn, sowie durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 113).

LITERATURVERZEICHNIS

Atkinson, G., Ennis, M. & Pearce, F.L. (1979)
Br.J.Pharmac. 65, 395 - 402

Bailey, K. (1948)
Biochem.J. 43, 271 - 279

Benditt, E.P. & Arase, M. (1959)
J.Exp.Med. 110, 451 - 460

Cahill, G.F.jr., Aoki, T.T. & Marliss, E.B. (1972)
in Handbook of Physiology, Endocrinology, sect.7, vol.I
pp 563 - 577 Am.Physiol.Soc., Washington D.C.

Dahlmann, B. & Reinauer, H. (1978)
Biochem.J. 171, 803-810

Dahlmann, B., Schroeter, C., Herbertz, L. & Reinauer, H. (1979)
Biochem.Med. 21, 33 - 39

Dice, J.F., Walker, C.D., Byrne, B. & Cardiel, A. (1978)
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 75, 2093 - 2097

Drabikowski, W., Goreka, A. & Jakubiec-Puka, A. (1977)
Int.J.Biochem. 8, 61 - 71

Ebashi, S., Kodama, A. & Ebashi, F. (1968)
J.Biochem. 64, 465 - 477

Fulks, R.M., Li, J.B. & Goldberg, A.L. (1975)
J.Biol.Chem. 250, 290 - 298

Goldberg, A.L. & St. John, A.C. (1976)
Ann.Rev.Biochem. 45, 747 - 803

Jany, K.D. (1976)
Comp.Biochem.Physiol. 53, B 31 - 38

Katunuma, N., Kominami, E., Kobayashi, K., Banno, Y., Suzuki, K.,
Chichibu, K., Hamaguchi, Y. & Katsunuma, T. (1975)
Eur.J.Biochem. 52, 37 - 50

Kawiak, J., Vensel, W.H., Komender, J. & Barnard, E.A. (1971)
Biochem.Biophys.Acta 235, 172 - 187

Li, J.B. & Goldberg, A.L. (1976)
Am.J.Physiol. 231, 441 - 448

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951)
J.Biol.Chem. 193, 265 - 271

Maurer, H.R. (1971)
"Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel electrophoresis", pp 43 - 52, Walter de Gruyter, Berlin and New York

Mayer, M., Amin, R. & Shafrir, E. (1974)
Arch.Biochem.Biophys. 161, 20 - 25

Noguchi, T. & Kandatsu, M. (1971)
Agr.Biol.Chem. 35, 1092 - 1100

Noguchi, T. & Kandatsu, M. (1976)
Agr.Biol.Chem. 40, 927 - 933

Pastan, I. & Almquist, S. (1966)
Endocrinology 78, 361 - 366

Park, D.C., Parsons, M.E. & Pennington, R.J. (1973)
Biochem.Soc.Trans. 1, 730 - 733

Pennington, R.J.T. (1977)
in "Proteinases in mammalian cells and tissues" (Barret,A.J., ed.) pp 515 - 543, Elsevier/North-Holland Publishing Comp. Amsterdam, New York, Oxford

Perry, S.V. (1955)
in Methods Enzymol. Vol. II (Colowick, S.P., Kaplan, N.O., eds.) pp 582 - 588, Academic Press Inc., New York

Porzio, M.A. & Pearson, A,M. (1977)
Biochem.Biophys.Acta 490, 27 - 43

Reinauer, H. & Dahlmann, B. (1979)
in "Biological functions of proteinases" (Holzer, H., Tschesche, H., eds.) pp 94 - 101, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

Röthig, H.J., Stiller, N., Dahlmann, B. & Reinauer, H. (1978)
Horm.Metab.Res. 10, 101 - 104

Sanada, Y., Yasogawa, N. & Katunuma, N. (1978)
Biochem.Biophys.Res.Comm. 82, 108 - 113

Schwert, G.W. & Takenaka, Y. (1955)
Biochem.Biophys.Acta, 16, 570 - 575

Starkey, B.M. & Barrett, A.J. (1976 a)
Biochem.J. 155, 273 - 278

LEBENSLAUF

Geboren am 9.Oktober 1953 in Düsseldorf als Sohn des Dr.med.Eberhard Fischer und Frau Karla Fischer, geb. Hogrebe.

- 1960 - 1964	Besuch der Grundschule in Düsseldorf und Duisburg-Rheinhausen
- 1964 - 1972	Besuch des Staatl.Landfermann-Gymnasiums, Duisburg
- 1969/1970	Einjähriger Aufenthalt als Austauschschüler in den Vereinigten Staaten von Amerika
- 1972	Abitur
- Oktober 1972	Beginn des Studiums der Medizin an der Universtät Düsseldorf
- August 1974	Ärztliche Vorprüfung
- August 1975	1.Teil der Ärztlichen Prüfung
- April 1978	2.Teil der Ärztlichen Prüfung
- 1978/1979	Praktisches Jahr an den Städtischen Krankenanstalten in Krefeld
- Mai 1979	3.Teil der Ärztlichen Prüfung
- Juli 1979 - Sept. 1980	Grundwehrdienst als Stabsarzt bei der Bundeswehr
- Seit Oktober 1980	Tätigkeit als Assistenzarzt in der Inneren Abteilung des Wilhelm-Anton-Hospitals in Goch

FOTODRUCK J. MAINZ — Telefon: (02 41) 2 73 05
Neupforte 13, Nähe Markt, 5100 Aachen